

V. PEMBAHASAN

5.1 Komposisi Kimia Bahan Baku Biji Jali

Bahan baku biji jali yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jatinangor. Biji jali yang dipilih berasal dari jenis biji jali lunak atau pulut varietas *mayuen* yang biasa digunakan sebagai produk olahan pangan. Proses penanganan biji jali dilakukan dengan menghilangkan kulitnya terlebih dahulu, kemudian dihancurkan menjadi tepung untuk dianalisa sifat kimianya. Parameter yang dianalisa dari biji jali antara lain air, abu, protein, lemak, serat kasar dan pati. Parameter komposisi kimia biji jali disajikan pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Komposisi Kimia Bahan Baku Biji Jali

Parameter sifat kimia	Hasil analisis	Literatur
Air (%)	12,20 \pm 0,24	11,2 ^a
Abu (%)	0,36 \pm 0,04	1,90 ^a
Protein (%)	10,68 \pm 0,08	9,11 ^b
Lemak (%)	0,16 \pm 0,06	0,45 ^b
Serat Kasar (%)	0,60 \pm 0,01	0,41 ^b
Pati (%)	51,67 \pm 0,08	52,00 ^b

Keterangan : ^aKumar *et al.* (2014), ^bLeila (2014)

Rata-rata \pm SD (n=duplo untuk setiap perlakuan)

Hasil analisa sifat kimia biji jali pada Tabel 5.1 menghasilkan sedikit perbedaan dengan literatur. Perbedaan yang terjadi dapat disebabkan karena banyak hal seperti iklim dan kondisi geografis. Selain itu, kondisi dan lama penyimpanan juga dapat mempengaruhi kandungan nutrisi dan susut bobot pada jali selama penyimpanan. Dalam analisa diperoleh kadar air yang lebih tinggi sebesar 12,20% dibandingkan dengan literatur sebesar 11,2% akibat adanya laju respirasi yang tinggi yang mempengaruhi susut bobot (Nurrahman, 2005). Hasil analisa kadar protein menghasilkan nilai sebesar 10,68% lebih besar dibandingkan dengan literatur yaitu 9,11%. Jali mengandung protein utama yaitu *coixol* dan *coixenolide*, dimana kedua protein tersebut sering digunakan sebagai pencegahan terhadap kanker karena tinggi akan kandungan asam amino prolin dan leusin (Chhabra and Gupta, 2015)

Jali merupakan jenis serelia yang mengandung karbohidrat dalam bentuk pati yang kadarnya sangat tinggi sebesar 51,67%. Nilai tersebut tidak berbeda jauh dengan literatur yaitu 52%. Pati yang terbentuk diakibatkan karena adanya polimerasi dari gula sederhana dari reaksi enzimatis selama metabolisme

(Widaningrum dkk., 2012). Kandungan pati berhubungan dengan pembentukan serat, dimana dalam analisa serat kasar yang dihasilkan lebih tinggi sebesar 0,60% dibandingkan literatur yaitu 0,41%. Pembentukan serat dihasilkan dari penurunan kadar pati akibat adanya aktifitas enzim amilase selama metabolisme sehingga nilai serat yang dihasilkan lebih tinggi (Richana dan Sunarti, 2004).

5.2 Rendemen Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan

Proses ekstraksi jali dilakukan dengan metode *hot water extraction* untuk mendapatkan senyawa fruktooligosakarida (FOS) dan glukan. Metode *alkaline extraction* digunakan untuk mendapatkan senyawa arabinoxylan. Sebelum dilakukan proses ekstraksi, biji jali dilakukan penyosohan terlebih dahulu, kemudian dihaluskan dengan ayakan *mesh* 60. Ukuran tersebut dapat menghasilkan partikel tepung yang seragam dengan permukaan kontak yang luas sehingga pelarut mudah masuk untuk mengekstraksi bahan (Agbenorhevi *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2013). Rata-rata rendemen senyawa fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan (%) jali dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Rendemen Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida, Glukan dan Arabinoxylan

Jenis ekstrak	Rerata rendemen (%)
Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS)	14,43 \pm 0,06
Ekstrak Kasar Glukan	10,80 \pm 0,09
Ekstrak Kasar Arabinoxylan	3,18 \pm 0,06

Keterangan : Rata-rata \pm SD (n=duplo)

Pada Tabel 5.2 rerata rendemen ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) sebesar 14,43 \pm 0,06%, glukan sebesar 10,80 \pm 0,09% dan arabinoxylan sebesar 3,18 \pm 0,06%. Ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) menghasilkan rendemen tertinggi dibanding ekstrak lainnya. Hal ini disebabkan karena kelarutan fruktooligosakarida (FOS) dipengaruhi oleh gugus hidroksil yang mengikat fruktooligosakarida (FOS) dengan air, dimana gugus tersebut bersifat hidrofilik yaitu memiliki kelarutan yang tinggi terhadap air. Sifat fruktooligosakarida (FOS) yang larut dalam air panas mempercepat senyawa tersebut terekstrak keluar dari sel sehingga menghasilkan rendemen fruktooligosakarida (FOS) yang tinggi (Puminat *and* Teangpook, 2013).

Hasil ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) berasal dari supernatan atau filtrat hasil sentrifugasi, dimana manfaat sentrifugasi dapat memisahkan senyawa fruktooligosakarida (FOS) dengan senyawa lainnya seperti pati, lemak dan protein (Apriyanto dan Sanjaya, 2014). Semakin tinggi kecepatan putaran sentrifugasi maka supernatan yang diperoleh semakin tinggi akibat gaya sentrifugal yang bekerja pada pelarut dalam mempercepat pemisahan (Earle 1983). Rendemen pada ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) adalah 14,43% lebih tinggi dibandingkan dengan Pisang 5-10% dan daun *Stevia rebaudiana* (Bert.) sebesar 4,6% (de Oliveira *et al.*, 2011; Kurtoglu *et al.*, 2011).

Proses ekstraksi fruktooligosakarida (FOS) dilakukan secara bersamaan dalam mengekstraksi glukukan. Keduanya menggunakan pelarut air dengan metode *hot water extraction* pada suhu 80°C selama 60 menit (De Maura *et al.*, 2011; Manosroi *et al.*, 2014). Penggunaan air sebagai pelarut pada ekstraksi fruktooligosakarida (FOS) dan glukukan disebabkan karena kedua senyawa tersebut bersifat larut dalam air dibandingkan dengan pelarut lainnya (Widyastuti, 2013; Manosroi *et al.*, 2014). Air merupakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang tinggi dimana hanya material tertentu yang keluar dari sel sehingga hasil ekstraksi cenderung lebih murni (Chamidah dkk., 2013).

Tahapan proses ekstraksi antara ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) dan glukukan, dibedakan berdasarkan tahapan pengendapan (*presipitasi*) yang dilakukan pada ekstrak kasar glukukan. Proses *presipitasi* akan mengendapkan senyawa glukukan yang tidak mampu berinteraksi dengan etanol karena sifat kelarutannya yang kecil. Etanol yang ditambahkan pada ekstrak dapat menggantikan interaksi glukukan dengan air dengan membentuk suatu interaksi hidrogen antara air dan etanol (Fajri, 2009). Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 90% dalam memisahkan senyawa glukukan yang terlarut dalam air. Menurut Ningrum dan Wahyu (2011) konsentrasi larutan pengendap (*co-solvent*) yang tinggi dapat mempengaruhi kelarutan air pada etanol sehingga tegangan air dengan glukukan akan menurun. Hal tersebut dapat disebabkan karena tingginya nilai *driving force* yang menyebabkan endapan semakin banyak. Sebaliknya jika etanol yang ditambahkan dengan konsentrasi yang rendah maka hanya menggumpalkan glukukan sebagian saja. Rendemen ekstrak kasar glukukan dari biji jali menghasilkan nilai yang lebih tinggi sebesar $10,80 \pm 0,09\%$ dibandingkan dengan penghasil glukukan lainnya seperti Alga (*Chlorella vulgaris*) sebesar 6,06%, buah Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) sebesar 0,2% dan Mangga (*Mangifera indica*

L.) sebesar 16,3% (Tabarsa *et al.*, 2015; Cordeiro *et al.*, 2015; Wiater *et al.*, 2013).

Proses ekstraksi menggunakan pelarut alkali pada suhu 80°C menghasilkan ekstrak kasar arabinoxylan. Sesuai dengan penelitian Zhang *et al.* (2014) bahwa hasil ekstraksi arabinoxylan pada suhu dibawah 100°C dapat memutus kompleksitas susunan senyawa dari arabinoxylan dibandingkan dengan pelarut lainnya. Suhu yang tinggi dan lama kontak antara solut dan pelarut selama proses ekstraksi menggunakan pelarut alkali dapat mempengaruhi laju ekstraksi yang cepat untuk meningkatkan kelarutan bahan, sebaliknya bila suhu yang rendah dan kontak solut dengan pelarut berlangsung cepat maka laju ekstraksi akan berjalan dengan lambat dan menghasilkan kelarutan material yang rendah (Ramadhan *and* Phaza, 2010).

Pelarut yang digunakan untuk menghasilkan ekstrak arabinoxylan yaitu menggunakan natrium hidroksida (NaOH) dengan sedikit penambahan hidrogen peroksida (H₂O₂). Peran natrium hidroksida berfungsi untuk memutuskan ikatan ester antara arabinoxylan dengan komponen lainnya. Menurut Bataillon *et al.* (1998) konsentrasi natrium hidroksida sangat mempengaruhi dalam menghilangkan lignin yang terikat dengan arabinoxylan. Lignin merupakan jaringan polimer fenolik yang mengikat arabinoxylan dengan kuat, dimana dengan penambahan NaOH dapat merusak struktur lignin dan membebaskan arabinoxylan yang memiliki rantai lebih pendek (Fitriani dkk., 2013).

Penambahan hidrogen peroksida (H₂O₂) dalam ekstraksi arabinoxylan dapat mengurangi ikatan hidrogen antar molekul arabinoxylan dan lignin (Doner *and* Hicks, 1997). Hidrogen peroksida merupakan oksidator yang mampu melepaskan oksigen dengan kuat dan mudah larut dalam air. Hidrogen peroksida (H₂O₂) akan bereaksi dengan natrium hidroksida (NaOH) untuk menghasilkan anion hidrogen peroksida. Anion peroksida aktif akan bereaksi kembali dengan dekomposisi hidrogen peroksida (H₂O₂) untuk menghasilkan radikal bebas hidroksil yang berperan dalam melarutkan arabinoxylan menjadi beberapa monomer monosakarida seperti arabinosa dan xylosa (Hollmann *and* Lindhauer, 2005).

Rendemen ekstrak kasar arabinoxylan dari jali sebesar 3,18 ± 0,06%, sama halnya dengan rendemen arabinoxylan pada barley sebesar 2,13%. Rendemen pada jali dan barley lebih kecil dibandingkan pada gandum sebesar 5,0% dan rye sebesar 7,9%. Hal ini disebabkan karena kandungan arabinoxylan

di dalam jali lebih sedikit dibandingkan jenis NSP (*Non starch polysaccharide*) lainnya dalam membentuk struktur dinding sel (Apirattananusornet *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011; Bursa *et al.*, 2016).

5.3 Komposisi Kimia Ekstrak Kasar Fructooligosakarida (FOS), glukukan dan Arabinoxylan

Ekstrak kasar fructooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan dianalisa komponen kimianya meliputi kadar protein, lemak, air, abu, serat kasar dan pati. Hasil analisa komposisi kimia ekstrak kasar fructooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan tersaji pada Tabel 5.3

Tabel 5.3 Komposisi Kimia Ekstrak Kasar FOS, glukukan dan Arabinoxylan

Parameter (%)	Ekstrak kasar FOS	Ekstrak Kasar Glukan	Ekstrak Kasar Arabinoxylan
Protein	6,30± 0,05	7,07± 0,02	5,67± 0,05
Lemak	0,06 ± 0,01	0,09± 0,03	0,04± 0,02
Air	6,22 ± 0,01	9,80 ± 0,05	7,44± 0,04
Abu	0,22± 0,07	0,19± 0,04	0,26± 0,03
serat kasar	0,25 ± 0,05	0,38± 0,03	0,22 ± 0,06
Pati	20,19 ± 0,02	34,89 ± 0,04	14,72 ± 0,03

Pada Tabel 5.3 nilai komposisi kimia secara keseluruhan dari ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan mengalami penurunan setelah melalui proses ekstraksi dibandingkan bahan baku. Kadar protein menurun pada tiap hasil ekstrak masing-masing $6,30 \pm 0,05\%$, $7,07 \pm 0,02\%$ dan $5,67 \pm 0,05\%$. Hal ini menunjukkan bahwa proses *deproteinasi* dengan suhu tinggi berjalan dengan baik. *Deproteinasi* adalah proses menghilangkan senyawa protein yang terikat kuat pada masing-masing hasil ekstrak. Bui *et al.* (2016) menyatakan bahwa protein yang terikat kuat pada ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) mengalami penurunan setelah dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan panas (*hot water extraction*). Hal ini disebabkan karena panas dapat memecah ikatan hidrogen pada protein yang ditandai dengan meningkatnya molekul energi kinetik sehingga kemampuan protein mengikat air menjadi menurun dan membuat struktur fruktooligosakarida (FOS) terbuka hingga memudahkannya larut dalam air panas. Sama halnya pada ekstrak kasar glukukan dan ekstrak kasar arabinoxylan, masing-masing senyawa

tersebut terikat pada protein membentuk suatu ikatan kovalen yang kuat, dimana dengan perlakuan panas dapat melemahkan ikatan antar protein dengan keduanya sehingga mendorong senyawa glukon dan arabinoxylan keluar dari matrik bahan (Sarossy *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013).

Komponen lainnya yang mengalami penurunan adalah lemak, dimana pengaruh lemak dalam proses ekstraksi dapat membatasi masuknya pelarut kedalam bahan sehingga dapat menghambat efisiensi dari proses ekstraksi. Kandungan lemak dari hasil ekstrak masing-masing sebesar $0,06 \pm 0,01\%$, $0,09 \pm 0,03\%$ dan $0,04 \pm 0,02\%$. Penurunan lemak pada semua ekstrak terjadi selama pemanasan, dimana lemak akan berubah menjadi asam lemak yang memiliki rantai hidrokarbon yang diterminasi dengan gugus asam karboksilat, penataan ini membuat molekul memiliki ujung hidrofilik yang polar dan memiliki sifat yang mudah larut dalam air. Sama halnya seperti penurunan air dan abu, dimana keduanya saling berhubungan dengan suhu pemanasan yang tinggi sehingga menyebabkan air yang terikat dalam jaringan lebih mudah menguap diikuti dengan pemekatan dari bahan-bahan yang tertinggal salah satunya yaitu mineral (Yuniarti dkk., 2013)

Kandungan serat kasar pada setiap ekstrak mengalami penurunan masing-masing adalah $0,25 \pm 0,05\%$, $0,38 \pm 0,03\%$ dan $0,22 \pm 0,06\%$, hal ini dapat disebabkan karena terjadinya pemecahan struktur serat kasar pada proses pemanasan. Perolehan nilai serat kasar berhubungan dengan kadar pati yang dihasilkan selama proses ekstraksi. Menurut Pratiwi dkk. (2012) pati yang terdegradasi oleh panas akan menurunkan nilai serat kasar dari suatu bahan. Semakin tinggi pati yang terdegradasi maka penurunan serat kasar pun semakin tinggi.

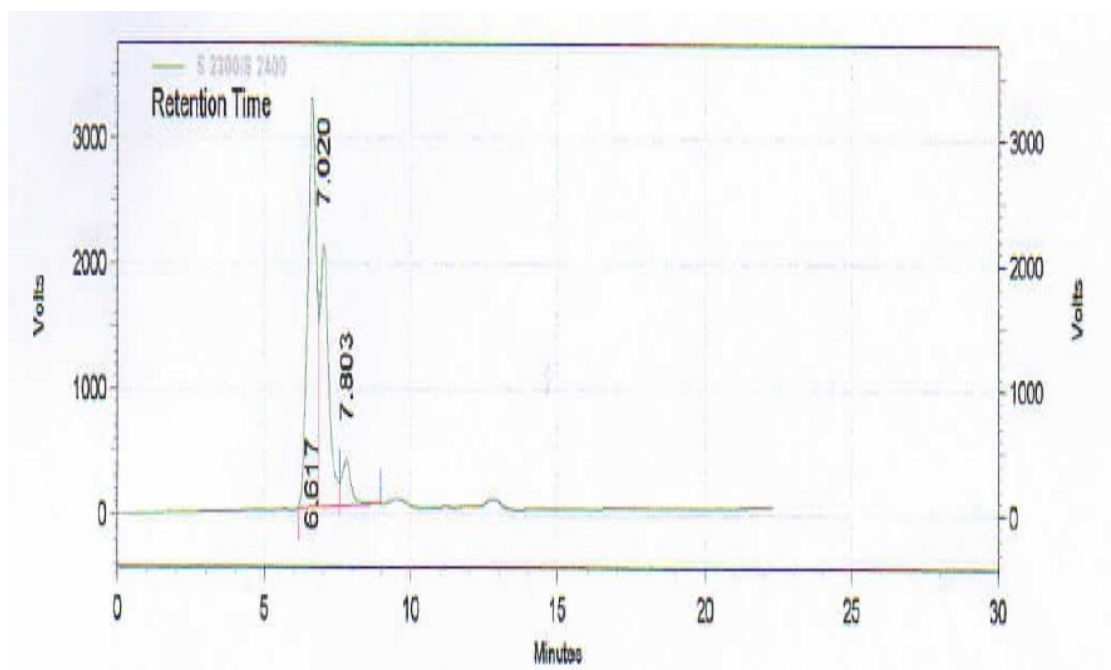
Kadar pati dari semua hasil ekstrak mengalami penurunan dari kadar pati bahan baku, namun kadar pati yang terkandung pada ekstrak kasar glukon masih sangat cukup besar sebesar $34,89 \pm 0,04\%$ dibandingkan hasil ekstrak lainnya, masing – masing sebesar $20,19 \pm 0,02\%$ dan $14,72 \pm 0,03\%$. Hal ini dapat diakibatkan karena hasil ekstrak kasar glukon diperoleh dari residu hasil pengendapan dengan etanol sehingga kandungan pati yang terdapat di dalam ekstrak kasar glukon masih tinggi. Selain itu, kandungan pati yang tinggi dalam ekstrak kasar glukon dapat disebabkan karena adanya pati dari fraksi amilopektin yang tidak terlarut saat proses ekstraksi dengan air sehingga masih terikat pada matriks bahan (Kartikasari dkk., 2016). Sesuai penelitian Yamada *et al.* (1985)

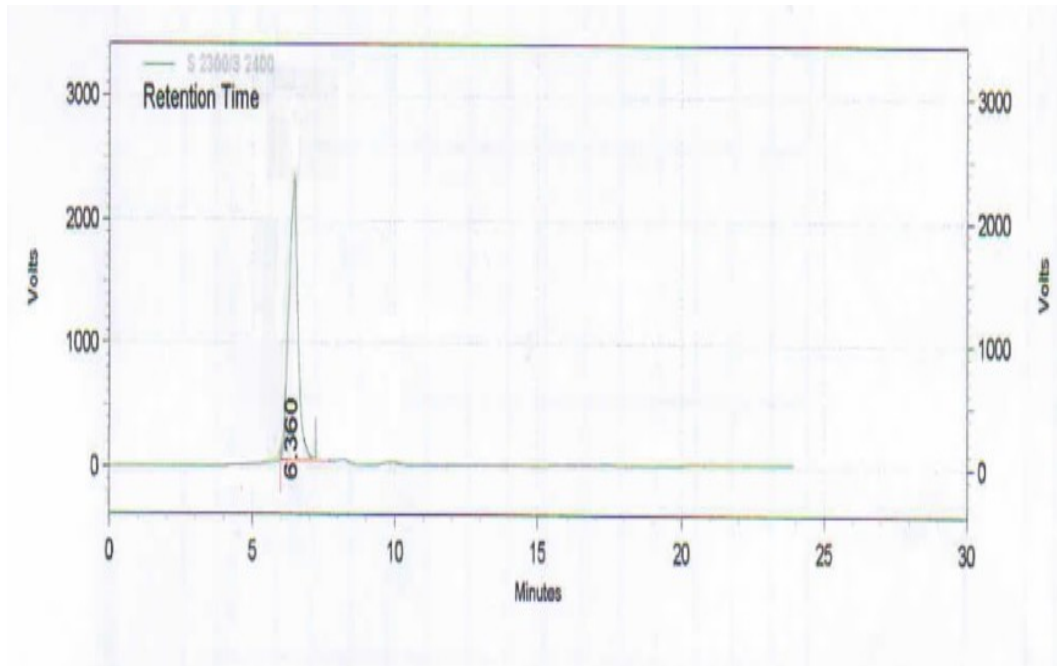
ekstrak air hasil pengendapan etanol pada jali termasuk dalam glukukan yang strukturnya mirip dengan amilopektin. Sifat amilopektin tidak larut dalam air, memiliki ukuran yang lebih besar dibanding amilosa dan memiliki tingkat percabangan yang tinggi (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Rantai cabang dari amilopektin menyebabkan ikatan antar rantai lebih kuat dan strukturnya lebih stabil, sedangkan ukuran granula pati yang besar pada amilopektin memiliki suhu gelatinisasi yang lebih tinggi dan lebih sulit terurai dengan air maupun panas karena adanya ikatan hidrogen yang terikat kuat dengan matriks bahan (Murtiningrum dkk., 2012).

5.4 Hasil Identifikasi Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinosylian

5.4.1 Identifikasi Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS) menggunakan HPLC

Senyawa fruktooligosakarida (FOS) dianalisa dengan menggunakan HPLC Aminex HPX-87C. Standar FOS yang digunakan terdiri dari campuran 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) dan 1-β-D-fructofuranosylnystose (GF₄). Standar diinjeksikan sebesar 240 µl dengan konsentrasi 1,024%. Puncak kromatogram FOS pada standar dan sampel jali dapat dilihat pada Gambar 5.1 (a) standar FOS (b) sampel jali





Gambar 5.1. Kromatogram HPLC (a. Standar FOS, b. Sampel Jali; GF₂: 1-kestose, GF₃: nystose, GF₄: 1-β-D-fructofuranosylnystose)

Kromatogram pada Gambar 5.1 (a) menunjukkan tiga puncak dari FOS standar, dimana *retention time* (RT) yang dihasilkan yaitu GF₄ pada RT 6,617, GF₃ pada RT 7,020 dan GF₂ RT 7,803. Senyawa golongan GF₄ muncul lebih awal pada kromatogram karena panjang monomer yang terbentuk lebih banyak yaitu terdiri dari 1 glukosa dan 4 fruktosa, sehingga menghasilkan waktu retensi yang lebih cepat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hogart *et al.* (2000) golongan GF₄ dari FOS memiliki gugus OH yang lebih panjang dibandingkan dengan GF₂ dan GF₃. Semakin kuat interaksi antara air sebagai fase gerak dengan GF₄ yang memiliki gugus OH yang lebih panjang maka menghasilkan waktu retensi yang semakin singkat. Sesuai dengan prinsip HPLC yaitu pemisahan komponen yang terdapat di dalam senyawa dapat dibedakan berdasarkan kepolarannya pada fase gerak dan fase diam. Bila komponen dalam senyawa tersebut memiliki kepolaran yang hampir sama dengan fase diam maka menunjukkan waktu retensi yang lebih lambat, namun jika kepolarannya lebih mirip dengan fase gerak maka akan terdistribusi dengan waktu retensi yang lebih cepat (Ardianingsih, 2010). Fase gerak yang digunakan adalah aquades yang bersifat polar, sedangkan kolom sebagai fase diam mengandung matriks kopolimer stirena divinil benzena yang bersifat non-polar. Interaksi antara fase diam yang bersifat non polar akan

mengikat komponen GF₂ dan GF₃ yang memiliki nilai polaritas yang hampir sama dengan fase diam, sehingga waktu distribusi lebih lama dibandingkan dengan GF₄ (1-β-D-fructofuranosylnystose).

Kopolimer stirena divinil benzena adalah senyawa non polar yang terdiri dari rantai hidrokarbon yang panjang dari proses pembentukan membran kation dan anion (Sidwell *et al.*, 2006). Penggunaan stirena divinil benzena sebagai matriks kolom Aminex HPX 87C dikarenakan mampu memisahkan senyawa yang memiliki interaksi hidrofobik yang sama antara bahan dengan matriks sebagai fase diam. Aminex HPX 87C merupakan jenis kolom yang sensitif dalam mendeteksi berbagai jenis gula. Hal ini sesuai dengan penelitian Ribeiro *et al.* (2010) dengan menggunakan kolom Aminex HPX 87C dapat memisahkan karbohidrat jenis oligosakarida, glukosa dan fruktosa dengan menghasilkan RT oligosakarida yang lebih cepat dibandingkan glukosa dan fruktosa. Hal ini disebabkan karena oligosakarida memiliki gugus hidroksil yang lebih banyak dibandingkan dengan glukosa dan fruktosa. Sama halnya penelitian Zuleta *and* Sambucetti (2001) yaitu memisahkan antara inulin, disakarida, glukosa dan fruktosa menghasilkan nilai RT pada inulin lebih cepat dibandingkan jenis gula lainnya.

Senyawa fruktooligosakarida (FOS) dihasilkan dari ekstraksi dengan pelarut air dengan suhu 80°C, dimana pada suhu tinggi >70°C pati akan tergelatinisasi dengan terpecahnya ikatan hidrogen yang menghasilkan sebagian polimer fruktan terdegradasi membentuk oligosakarida terutama fruktooligosakarida (Susilowati dkk., 2015). Kromatogram fruktooligosakarida (FOS) dari sampel jali pada Gambar 5.2 (b) berada pada *retention time* (RT) 6,36 dengan konsentrasi GF₄ (1-β-D-fructofuranosylnystose) yang dihasilkan sebesar 40,78% (Lampiran 12). Proses identifikasi FOS dalam sampel hanya menghasilkan satu puncak yang diidentifikasi sebagai golongan GF₄ (1-β-D-fructofuranosylnystose) karena waktu retensi yang dihasilkan antara GF₄ standar dengan sampel tidak berbeda jauh. Puncak kromatogram untuk GF₃ (nystose) dan GF₂ (kestose) tidak terdeteksi, hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi antara kedua golongan fruktooligosakarida (FOS) dalam biji jali lebih sedikit dibandingkan dengan golongan GF₄, sehingga tidak terdeteksi pada kromatogram HPLC. Selain itu dapat disebabkan karena ekstraksi menggunakan air yang bersifat polar hanya dapat memecah salah satu komponen FOS seperti 1-β-D-fructofuranosylnystose (GF₄) yang memiliki gugus samping OH yang lebih panjang dibandingkan GF₂

dan GF_3 , sehingga menyebabkan kelarutannya lebih tinggi terhadap air. Hasil ekstraksi menggunakan air sama halnya dengan sintesis fruktooligosakarida (FOS) hasil hidrolisis dari substrat inulin yang diekstrak dari *chicory*, dimana komponen fruktooligosakarida (FOS) yang dihasilkan tidak spesifik yaitu terdiri dari banyak unit penyusun fruktooligosakarida (FOS) atau disebut dengan oligofruktosa hingga menghasilkan nilai DP hingga 1-9 (Singh *et al.*, 2010). Berbeda dengan komponen fruktooligosakarida (FOS) komersil seperti pada standar, proses sintesis fruktooligosakarida (FOS) dilakukan secara transfruktosilase atau menggunakan enzim β -fruktofuranosidase yang dapat memutus masing masing komponen fruktooligosakarida (FOS) secara spesifik sehingga nilai DP yang dihasilkan lebih rendah (DP 2-4).

5.4.2 Identifikasi glukukan menggunakan FTIR

Analisa menggunakan FTIR bertujuan untuk menentukan jenis ikatan glukukan yang terdapat di dalam jali. Umumnya glukukan terdiri dari ikatan alpha (α) dan ikatan beta (β), dimana perbedaan keduanya dapat dibedakan berdasarkan karakteristik ikatan glikosidik dan struktur kimianya. Ikatan alpha (α) terdiri dari dekstran (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- α -d-glukan), amilopektin (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -d-glukan), pullulan (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -d-glukan dan amilosa (1 \rightarrow 4)- α -d-glukan, sedangkan ikatan beta (β) terdiri dari laminarin (1 \rightarrow 3)- β -d-glukan, selulosa (1 \rightarrow 3)- β -d-glukan, pustulan (1 \rightarrow 6)- β -d-glukan dan lentinan (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -d-glukan (Synytsa and Novak, 2003). Kedua jenis ikatan glukukan tersebut baik itu alpha (α) maupun beta (β) dapat dibedakan berdasarkan pola absorbansi dan vibrasi (gerakan) dari masing-masing senyawa menggunakan FTIR (Lampiran 13).

Prinsip kerja FTIR yaitu mengetahui gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah sesuai dengan pola absorbansi dan vibrasi (gerakan) yang khas dari masing-masing senyawa. Pola absorbansi dan vibrasi dari tiap senyawa berbeda-beda sehingga senyawa dapat dibedakan dan dikuantifikasi (Sankari, 2010). Sampel jali dianalisa menggunakan FTIR dengan membandingkan pola absorbansi dengan standar. Hasil pengujian FTIR menunjukkan bahwa sampel jali menghasilkan pola absorbansi yang mirip dengan standar dengan adanya ikatan glikosidik yang terdiri dari gugus gugus –OH, –CH dan C-O. Berikut bilangan gelombang standar dan sampel disajikan pada Tabel 5.4

Tabel 5.4 Bilangan Gelombang Standar dan Sampel Jali

Referensi (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang standar β -glukan (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang sampel ekstrak air (II) jali (cm ⁻¹)	Ikatan
3750-3000	3325,81	3420,23	Hidroksil (OH)
3000-2700	2924,65	2942,00	Alkana C-H (<i>stretching</i>)
1300-800	1082,75	1078,90	C-OH (<i>bending</i>)
930, 850 dan 765	nd	764,42, 859,03, 928,46	1,4 α -D-glukan
1155 dan 1023	nd	1156,04 dan 1022,96	1,6 α -D-glukan

Keterangan : (nd= tidak terdeteksi)

Pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa glukukan standar maupun ekstrak kasar glukukan dari jali mengandung gugus OH (alkohol atau hidroksil) masing-masing pada bilangan gelombang 3325,81 cm⁻¹ dan 3420,23 cm⁻¹. Bilangan gelombang gugus OH berada pada kisaran 3750-3000 (Widyastuti dkk., 2013). Gugus C-H terdeteksi pada glukukan standar maupun ekstrak kasar jali masing-masing pada bilangan gelombang 2924,65 cm⁻¹ dan 2942,00 cm⁻¹. Gugus C-H menunjukkan vibrasi regangan (*stretching*) asimetrik. Sejumlah penelitian menyebutkan bilangan gelombang gugus C-H berada pada kisaran 3000-2700 (Synytsya and Novak, 2014). Gugus C-OH standar glukukan berada pada bilangan gelombang 1082,75 cm⁻¹ sedangkan untuk sampel ekstrak kasar jali berada pada bilangan gelombang 1078,90 cm⁻¹. Gugus C-OH menunjukkan vibrasi *bending* dengan bilangan gelombang 1300-800 cm⁻¹ (Synytsya and Novak, 2014).

Jenis glukukan yang terdapat di dalam sampel jali menunjukkan bilangan gelombang yang mendekati ikatan alpha (α) yaitu 764,42, 859,03, 928,46 cm⁻¹ dengan struktur molekul 1,4 α -D-glukan sedangkan pada standar mengandung jenis ikatan beta dengan struktur 1-3 β -D-glukan pada bilangan gelombang 891,81 cm⁻¹ dengan intensitas yang tinggi. Menurut Synytsya and Novak (2014) jenis ikatan 1,4 α -D-glukan ditunjukkan dengan bilangan gelombang yang mendekati 930, 850 dan 765 cm⁻¹. Selain itu, pada sampel jali menunjukkan struktur molekul 1,6 α -D-glukan yang terdeteksi pada bilangan gelombang 1156,04 dan 1022,96 cm⁻¹, dimana pada standar tidak terdeteksi ikatan 1,6 α -D-glukan karena standar mengandung struktur 1-6- β -D-glukan dengan bilangan gelombang 1159,91 dan 1042,25 cm⁻¹. Menurut Synytsya and Novak (2014) jenis

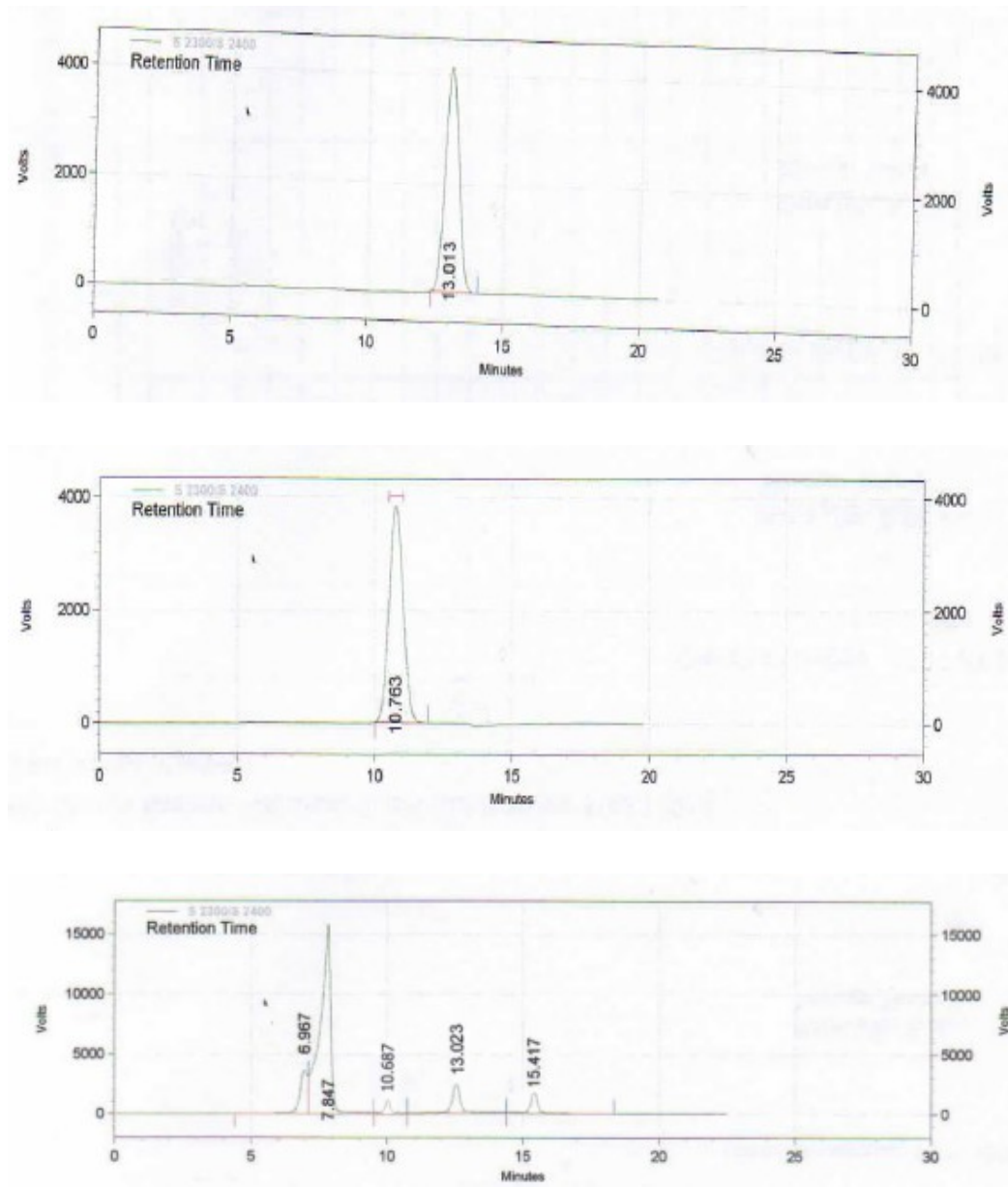
ikatan 1,6 α -D-glukan ditunjukkan dengan bilangan gelombang yang mendekati 1155 dan 1023.

Bilangan gelombang yang dihasilkan dari sampel jali menunjukkan glukukan dengan jenis ikatan alpha (α) dengan struktur molekul (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6) α -D-glukan. Hal ini sesuai dengan penelitian Yamada *et al.* (1985) bahwa jenis glukukan yang terdapat dalam jali termasuk dalam α -glukan yang bersifat larut air dengan ikatan rantai yang menyerupai dengan amilopektin. Senyawa α -glukan tergolong dalam homopolisakarida yang hanya tersusun dari satu jenis gula yaitu glukosa (Volman *et al.*, 2010). Kandungan glukosa di dalam α -glukan sebanyak >90% dengan nilai derajat polimerasi (DP) hingga 50.000 unit glukosa dan berat molekul antara 10^7 – 10^8 Da (Boediono, 2012). Sebagian besar golongan α -glukan berasal dari jenis fungi pada bagian dinding sel atau dalam bentuk cadangan gula dalam sel (Thitipraphunkul *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2002; Naessen *et al.*, 2005).

5.4.3 Identifikasi Arabinoxylan menggunakan HPLC

Arabinoxylan merupakan polisakarida selain pati (NSP = *non starch polysaccharide*) yang berperan sebagai penyusun dinding sel biji-bijian ((Blakeney *and* Flinn, 2005). Umumnya arabinoxylan terdiri dari *backbone* atau kerangka utama linier xilan yang terdiri dari xilosa dengan rantai cabang arabinosa, dimana keduanya berikatan silang dengan mikrofibril selulosa, sehingga menghasilkan jaringan yang kaku pada dinding sel (Hald *et al.*, 2016).

Senyawa arabinoxylan dapat diketahui dari kadar monomer pembentuknya yaitu arabinosa dan xilosa dengan menggunakan HPLC Aminex HPX 87C. Standar yang digunakan terdiri dari arabinosa dan xilosa yang masing-masing diinjeksikan sebesar 240 μ l dengan konsentrasi 1,024%. Masing-masing kadar arabinosa dan xilosa hasil HPLC, dianalisa lebih lanjut dengan membandingkan ratio keduanya untuk mengetahui besarnya nilai substitusi pada rantai utama xilan dengan arabinosa (Ara/Xyl) (Izydorczyk *and* Biliarderis, 2007). Kromatogram arabinosa dan xilosa antara standar dan sampel masing-masing dapat dilihat pada Gambar 5.2 (a) standar arabinosa (b) standar xilosa dan (c) sampel jali



Gambar 5.2 Kromatogram HPLC (a) Standar Arabinosa (b) Standar Xilosa dan (c) Sampel Jali

Pada Gambar 5.2 (a) dan (b) menunjukkan kromatogram standar dengan puncak arabinosa pada RT 13,013 dan xilosa pada RT 10,763. Ekstrak alkali jali pada Gambar 5.2 (c) menghasilkan lima puncak pada kromatogram dan terdapat dua puncak yang diindikasikan sebagai arabinosa dan xilosa yaitu RT 13,023 dan RT 10,687. Puncak yang paling besar sebelum xilosa kemungkinan merupakan hemiselulosa yang belum terhidrolisis sempurna menjadi monomer xilosa dan arabinosa. Puncak xilosa pada kromatogram muncul lebih awal

dibandingkan arabinosa, hal ini dapat disebabkan karena perbedaan sifat polaritas terhadap air sebagai fase gerak yang bersifat polar dan stirine divinyl benzena sebagai fase diam yang bersifat non polar (Sidwell *et al.*, 2006).

Monomer xilosa dan arabinosa termasuk gula pentosa dengan rumus molekul yang sama yaitu $C_5H_{10}O_5$, tetapi keduanya memiliki perbedaan terhadap kelarutan terhadap air atau *hidrofilik*, konfigurasi stereokimia dan sifat fisik seperti titik didih. Berdasarkan sifat kelarutannya terhadap air atau *hidrofilik* xilosa memiliki kelarutan yang lebih besar dibandingkan arabinosa sehingga xilosa bersifat lebih polar dan terbawa oleh fase gerak aquadest lebih cepat dibandingkan dengan arabinosa (Zaikov, 2005). Kepolaran pada xilosa ditentukan berdasarkan konfigurasi stereokimianya, dimana gugus OH pada xilosa terletak bersebrangan dengan gugus OH lainnya, sedangkan pada arabinosa hanya salah satu gugus OH yang terletak bersebrangan dengan gugus OH lainnya yang menyebabkan struktur arabinosa lebih stabil dan terikat kuat dengan fase diam, sehingga waktu retensi pada arabinosa lebih lama dibandingkan dengan xilosa (Suja, 2015). Kepolaran juga dapat dilihat berdasarkan sifat fisik dari titik didih dari suatu senyawa, dimana xilosa memiliki titik didih lebih besar yaitu $415,5^{\circ}C$ dibandingkan arabinosa yaitu $333,2^{\circ}C$. Titik didih berhubungan dengan gaya interaksi dipol dipol antar muatan, dimana semakin kuat interaksi antarmolekul maka semakin besar energi yang dibutuhkan untuk memutuskan gaya interaksi antarmolekul tersebut. Hal ini menyebabkan xilosa bersifat lebih polar dibandingkan arabinosa (Sunarya, 2007; Hidayat dkk., 2016).

Hasil pengujian HPLC arabinoxylan dari sampel jali menghasilkan kadar arabinosa dan xilosa masing-masing adalah 22,4% dan 4,8% (Lampiran 17 dan 18). Kadar arabinoxylan dapat berbeda beda sesuai dengan jenis biji-bijian, seperti pada gandum mengandung 33,5% arabinosa dan 65,8% xilosa, sedangkan pada jagung 33-35% arabinosa dan 48-54% xilosa (Gruppen *et al.*, 1992; Doner and Hicks, 1997). Monomer arabinosa dan xilosa dihasilkan dari proses hidrolisis menggunakan HCL (asam klorida). Umumnya hidrolisis secara asam dilakukan secara acak untuk memutus ikatan β 1 \rightarrow 4 xylopiranose pada kerangka utama xilan dalam menghasilkan xilosa, sedangkan pada bagian percabangan khususnya pada posisi karbon no 2 (2mXyl) dan 3 (3mXyl) akan memutus ikatan α -L arabinofuronase untuk menghasilkan produk utamanya yaitu arabinosa (Broekaert *et al.*, 2011). Rendahnya kadar xilosa yang dihasilkan dari

ekstrak kasar jali dapat disebabkan karena penetrasi asam tidak secara optimal memutus rantai utama xilan untuk menghasilkan gula sederhana seperti xilosa, melainkan hanya memutus rantai percabangan pada 2mXyl, 3mXyl atau keduanya dXyl dengan proporsi yang lebih tinggi dalam menghasilkan arabinosa (Hendarwin 2005, Darliah, 2008).

Kadar xilosa dan arabinosa kemudian dihitung berdasarkan nilai substitusi arabinosa pada rantai utama xilosa (Ara/Xyl) (Izydorczyk *and* Biliarderis, 2007). Derajat substitusi arabinoxylan dapat berbeda beda pada tanaman, disebabkan perbedaan proporsi dan variasi ikatan antara xilosa dan arabinosa, posisi substitusi dan keberadaan substituen lainnya yang khas (Hald *et al.*, 2016). Struktur arabinoxylan pada beberapa sereal terdiri atas “*backbone*” atau kerangka utama linier 1,4 β -D-xilan yang dapat disubstitusi pada unit rantai cabang C-(O)-2 (2mXyl), C-(O)-3 (3mXyl) atau keduanya C-(O)-2 dan C-(O)-3 (dXyl) dengan satu ikatan gugus α -L arabinofuranosil pada daerah percabangan (Broekaert *et al.*, 2011).

Derajat substitusi cabang arabinosa pada *backbone* xilan diperoleh rasio arabinosa terhadap xilosa (Ara/Xyl) yaitu 4,6%. Tingginya rasio yang dihasilkan antara arabinosa dan xilosa disebabkan karena proses hidrolisis lebih banyak memutus rantai cabang arabinosa, khususnya pada unit rantai C-(O)-3 (3mXyl) diikuti oleh rantai cabang C-(O)-2 dan C-(O)-3 (dXyl) dibandingkan rantai utama xilosa (Apirattananusorn *et al.*, 2008). Sama halnya menurut Sternemalm *et al* (2008) bahwa tingginya nilai substitusi Ara/Xyl dikaitkan dengan rantai samping arabinosa yang berkorelasi dengan kehilangan kapasitas pengikatan air selama proses hidrolisis sehingga menyebabkan penurunan viskositas dan pemecahan rantai arabinosa. Rasio Ara/Xyl pada jali dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan pada jenis sereal lainnya, seperti dari endosperm *rye* menghasilkan rasio (0,48-0,55), (Cleemput *et al.*, 1993). Sama halnya ditemukan pada dedak gandum dan dedak jagung menghasilkan rasio (Ara/Xyl) dengan masing masing antara (1,02-1,07) dan (0,75 –1,82). Perbedaan ratio dari tiap bahan terhadap rasio Ara/Xyl tergantung dari derajat percabangan masing-masing varietas dan spesies dari sumber bahan.

5.5 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan Terhadap Pertumbuhan *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei*

Potensi ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan sebagai prebiotik pada peningkatan jumlah bakteri probiotik jenis *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei* dapat diketahui menggunakan dua cara yaitu berdasarkan nilai absorbansi (OD) dan perhitungan *total plate count* (TPC). Nilai absorbansi umumnya menggunakan alat spektrofotometer untuk mengetahui kuantitas/densitas sel secara keseluruhan baik itu sel yang hidup maupun yang mati, sedangkan untuk mengetahui jumlah sel yang hidup saja dapat dilakukan berdasarkan perhitungan *total plate count* (TPC) (Critenden *et al.*, 2002).

Bakteri *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei* difermentasi pada medium fermentasi selama 24 jam dengan suhu 37°C sebagai suhu optimal pertumbuhan bakteri (Nikbakht *et al.* 2013). Pada setiap medium fermentasi diberikan penambahan masing-masing ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan dengan konsentrasi yang sama yaitu 2%, sesuai dengan penelitian sebelumnya sebagai konsentrasi optimal. Kaplan *and* Hutkins (2000) menyatakan bahwa penggunaan konsentrasi 2% dari berbagai jenis prebiotik dapat menstimulir peningkatan bakteri asam laktat jenis *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* dengan baik dibandingkan tanpa penambahan ekstrak (kontrol). Pengaruh penambahan jenis ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan terhadap nilai absorbansi (OD) *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei* dapat dilihat pada Tabel 5.5

Tabel 5.5 Rerata Nilai OD_{600 nm} *B. longum* dan *L. casei* Selama Fermentasi

Bakteri	Ekstrak	Rata-rata		
		Jam ke 0	Jam ke 18	Peningkatan
<i>L. casei</i>	Kontrol	0.014 ± 0,01	0.564 ± 0,01	0.550 ± 0,02 _a
	FOS	0.052 ± 0,03	0.776 ± 0,03	0.725 ± 0,01 _b
	Glukan	0.059 ± 0,03	0.769 ± 0,01	0.710 ± 0,02 _b
	Arabinoxylan	0.058 ± 0,01	0.607 ± 0,02	0.549 ± 0,02 _a
<i>B. longum</i>	Kontrol	0.013 ± 0,01	0.607 ± 0,04	0.594 ± 0,05 _a
	FOS	0.035 ± 0,02	0.906 ± 0,01	0.871 ± 0,02 _c
	Glukan	0.026 ± 0,01	0.784 ± 0,03	0.758 ± 0,03 _b
	Arabinoxylan	0.019 ± 0,02	0.762 ± 0,02	0.743 ± 0,04 _b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama, berbeda nyata pada uji BNT dengan α 1%

Pada Tabel 5.5 menunjukkan rerata total bakteri *L. casei* dan *B. longum* semua perlakuan berdasarkan nilai absorbansi (OD) pada jam ke 0 antara $0,013 \pm 0,01$ sampai $0,059 \pm 0,03$ dan terus mengalami peningkatan hingga jam ke 18 sebagai fase stasioner dengan pertumbuhan kedua bakteri sebesar $0,564 \pm 0,01$ sampai $0,906 \pm 0,01$. Pertumbuhan bakteri *B. longum* menghasilkan nilai OD paling tinggi dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) sebesar $0,871 \pm 0,02$ dibandingkan bakteri *L. casei* sebesar $0,725 \pm 0,01$. Hal ini dapat disebabkan karena kurangnya aktivitas enzim β -fruktofuranosidase pada *L. casei* dalam memanfaatkan ekstrak FOS. Menurut Watson *et al.*, (2013) tidak semua enzim β -fruktofuranosidase memiliki aktivitas hidrolitik yang tinggi dalam memecah ikatan glikosidik fruktooligosakarida (FOS) sehingga pemanfaatannya lebih kecil pada *L. casei* dibandingkan pada *B. longum*.

Dumitriu (2004) melaporkan bahwa bakteri golongan *Bifidobacterium* berdasarkan nilai absorbansi (OD) dengan penambahan fruktooligosakarida menghasilkan jumlah sel berkisar 0,065 hingga mencapai 1,017. Hal ini disebabkan karena bakteri *B. longum* memanfaatkan FOS dengan baik melalui sistem transport *bifidum* dengan bantuan enzim β -fruktofuranosidase untuk memecah ikatan glikosidik β (1 \rightarrow 2) atau β (1 \rightarrow 6) menjadi glukosa dan fruktosa yang selanjutnya akan dirubah menjadi asam asetat dan laktat (Pokusaeva *et al.*, 2011). Aktivitas enzim β -fruktofuranosidase pada beberapa strain golongan *Bifidobacterium* khususnya *B. longum* berperan sebagai enzim ekstraseluler yang membawa fruktooligosakarida kedalam sel dan menghidrolisisnya. Eksoenzim pada *B. longum* bersifat hidrolitik yang dapat menguraikan substrat kompleks menjadi molekul sederhana untuk digunakan bagi metabolisme sel (Rossi, 2005).

Pertumbuhan bakteri *B. longum* dan *L. casei* pada media kontrol menghasilkan nilai OD terendah. Hal ini disebabkan karena sumber karbon di dalam media kontrol untuk pertumbuhan kedua bakteri sangat terbatas. Pada media kontrol MRSB hanya terdiri dari mineral, vitamin dan protein dengan sumber karbon yang rendah, dimana kedua bakteri hanya memanfaatkan yeast ekstrak dan pepton sebagai sumber karbon sehingga pertumbuhannya lebih lambat dibandingkan bakteri yang diberi penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida, glukosa dan arabinoxylan (Salminen *et al.*, 2004). Penambahan ekstrak kasar arabinoxylan dan glukosa menghasilkan nilai OD yang

tidak berbeda nyata, baik itu pada bakteri *B. longum* dan *L. casei*, sehingga kedua perlakuan menghasilkan notasi yang sama. Walaupun tidak berbeda nyata antara kedua bakteri, tetapi perlakuan pada bakteri *B. longum* dengan penambahan kedua ekstrak tersebut menghasilkan nilai OD yang lebih besar masing-masing sebesar $0.743 \pm 0,04$ dan $0.758 \pm 0,03$ dibandingkan pada bakteri *L. casei* masing-masing sebesar $0.549 \pm 0,02$ dan $0.710 \pm 0,02$. Hal ini dapat disebabkan karena aktifitas enzim dari kedua bakteri tersebut berbeda dalam memanfaatkan substrat prebiotiknya.

Bakteri *B. longum* memiliki enzim ekstraseluler berupa xilanase dan arabinofuranosidase yang aktif memanfaatkan kelompok gula pentosa dari arabinoxylan untuk dijadikan sebagai karbon untuk menghasilkan metabolit utama berupa asam organik seperti asam asetat dan laktat (Margolles *et al.*, 2003). Bakteri *B. longum* menghidrolisis arabinoxylan melalui jalur fruktosa-6-phospat phosphoketolase atau *bifidum shunt* menghasilkan gula pentosa yang terdiri dari xilosa dan arabinosa. Selanjutnya dengan proses fosforilasi oksidatif ribulosa berisomerasi dengan xilulosa untuk membentuk ribulosa-5-phospat. Dua molekul xilulosa-5-fosfat dipecah menjadi 2-gliseradehid-3-phospat dan 2 asetil fosfat untuk menghasilkan 3 asetat dan 2 laktat (O'Callaghan *and* Sinderen, 2016).

Berbeda dengan bakteri *L. casei* yang merupakan bakteri heterofermentatif fakultatif, dimana bakteri golongan *Lactobacillus* sulit menghidrolisis gula pentosa. Bakteri *L. casei* membutuhkan waktu dan tambahan enzim untuk menghidrolisis gula pentosa (xilosa dan arabinosa) sehingga pertumbuhannya lebih lama dibandingkan *B. longum*. Bakteri *L. casei* menggunakan 2 jalur untuk merubah xilosa yaitu jalur glikolisis atau *Embden meyerhof pathway* dan pentosa phospat. Umumnya golongan *Lactobacillus* menggunakan jalur glikolisis atau *Embden meyerhof pathway* untuk menghidrolisis glukosa menjadi asam laktat, tetapi untuk mengkatabolisme gula pentosa *L. casei* membutuhkan enzim tambahan yaitu enzim phosphoketolase untuk masuk ke jalur pentosa phospat yaitu dengan memanfaatkan glukosa melalui tahapan perubahan 6-phospoglukonat dengan enzim fosfoglukonat dehidrogenase yang menghasilkan NADH untuk dioksidasi menjadi asetil pospat sehingga membentuk asam asetat (Kelkar *and* Mahanwar, 2015)

Penambahan ekstrak kasar glukan dengan jenis ikatan alpha (α) dari biji jali menghasilkan pertumbuhan bakteri *B. longum* lebih tinggi dibandingkan dengan

L. casei. Hal ini dapat disebabkan karena *L. casei* butuh waktu untuk beradaptasi untuk mendegradasi α -glukan yang termasuk dalam golongan pati dengan berat molekul yang tinggi sebagai sumber karbon (Moko., 2010). Umumnya golongan *Bifidobacterium* menggunakan substrat seperti D-galakosamin, D-glukosamin, amilosa, dan amilopektin pada proses fermentasinya, sehingga tidak mudah tumbuh pada sembarang substrat karena bakteri ini termasuk organisme yang *fastidius* atau pemilih (Ramesh *et al.*, 2006). Pada bakteri *B. longum* penambahan ekstrak kasar α -glukan dengan berat molekul yang tinggi dapat dengan baik dimanfaatkan karena memiliki berbagai macam kelompok enzim seperti α -amilase dan amilopululanase dengan sistem transport yang kompleks untuk mendegradasi secara langsung polisakarida dilingkungan membran untuk diangkut masuk kedalam sel (Zhao *and* Cheung 2011; Muller *et al.*, 2014).

Perhitungan *total plate count* pada penelitian ini dilakukan untuk memastikan nilai OD pada tiap perlakuan menghasilkan jumlah bakteri berkisar $>10^8$ sebagai syarat jumlah bakteri sebagai probiotik. Hasil dari pengukuran nilai absorbansi (OD) dengan perhitungan jumlah koloni (TPC) dapat dilihat pada Tabel 5.6

Tabel 5.6 Hasil Pengukuran Nilai OD dan Pengukuran Jumlah koloni (TPC)

Bakteri	Ekstrak	OD (x)	TPC (y)
<i>L. casei</i>	Kontrol	$0.550 \pm 0,02_a$	$6,3 \times 10^{10}$
	FOS	$0.725 \pm 0,01_b$	$7,7 \times 10^{11}$
	Glukan	$0.710 \pm 0,02_b$	$6,8 \times 10^{11}$
	Arabinoxylan	$0.549 \pm 0,02_a$	$7,1 \times 10^{10}$
<i>B. longum</i>	Kontrol	$0.594 \pm 0,05_a$	$6,8 \times 10^{10}$
	FOS	$0.871 \pm 0,02_c$	$9,3 \times 10^{11}$
	Glukan	$0.758 \pm 0,03_b$	$7,3 \times 10^{11}$
	Arabinoxylan	$0.743 \pm 0,04_b$	$7,80 \times 10^{11}$

Pada Tabel 5.6 menunjukkan pertumbuhan bakteri *L. casei* dan *B. longum* berdasarkan nilai absorbansi (OD) dan jumlah koloni (TPC) pada semua perlakuan. Penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) menghasilkan pertumbuhan bakteri *B. longum* yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, dengan nilai absorbansi (OD) sebesar $0,871 \pm 0,02$ dan jumlah koloni (TPC) sebesar $9,3 \times 10^{11}$, sedangkan pertumbuhan terendah dihasilkan oleh perlakuan tanpa penambahan ekstrak (kontrol) dengan nilai absorbansi (OD) sebesar $0,550 \pm 0,02$ dan jumlah koloni (TPC) sebesar $6,3 \times 10^{10}$. Pada setiap pertumbuhan bakteri nilai absorbansi (OD) saling berhubungan dan berbanding lurus dengan jumlah koloni, dimana semakin tinggi nilai absorbansi (OD) maka semakin tinggi

pula nilai jumlah koloni yang terdapat didalam medium. Oleh karena itu untuk mengetahui seberapa besar hubungan antara keduanya dilakukan analisa regresi yang dapat dilihat pada Gambar 5.3

Gambar 5.3 Hubungan antara nilai TPC dan OD pada Bakteri *B.longum* dan *L. casei* dengan Berbagai Perlakuan Penambahan Jenis Ekstrak kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan.

Pada Gambar 5.3 menunjukkan hubungan regresi linier antara nilai absorbansi (OD) dan jumlah koloni *L. casei* dan *B. longum* dengan persamaan $y = 4,464x + 8,421$ dan determinasi 0,85. Nilai determinasi tersebut diketahui bahwa 85% jumlah bakteri yang diukur berdasarkan jumlah koloni (TPC) dan nilai absorbansi (OD) menghasilkan korelasi yang positif dengan menunjukkan adanya hubungan/kekerabatan antara 2 variabel yang dibandingkan (jumlah koloni dan nilai absorbansi). Peningkatan jumlah koloni (TPC) dengan nilai absorbansi memiliki hubungan yang erat dimana semakin tinggi nilai absorbansi di dalam medium menunjukkan jumlah koloni semakin tinggi karena semakin besar cahaya yang diserap oleh bakteri tersebut. Begitupun sebaliknya bila cahaya yang diserap kecil maka jumlah bakteri di dalam medium rendah sehingga cahaya yang dilewatkan semakin banyak (Iswadi dkk., 2016).

5.6 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan Terhadap Nilai pH Bakteri *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei*

Derajat keasaman (pH) pada medium fermentasi dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan berlangsung selama fermentasi 24 jam. Fase stasioner pada jam ke-18 digunakan sebagai nilai pH terendah dari kedua bakteri. Derajat keasaman (pH) selama fermentasi akibat pengaruh penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan terhadap bakteri *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei* dapat dilihat pada Tabel 5.7

Tabel 5.7 Rerata Nilai pH *B. longum* dan *L. casei* Selama Fermentasi

Bakteri	Ekstrak	Rata-rata		
		Jam ke-0	Jam ke-18	Penurunan
<i>L. casei</i>	Kontrol	6.03 \pm 0,06	3.56 \pm 0,12	2.46 \pm 0,06 _a
	FOS	5.70 \pm 0,10	2.60 \pm 0,00	3.10 \pm 0,10 _b
	Glukan	5.76 \pm 0,15	2.56 \pm 0,15	3.20 \pm 0,20 _b
	Arabinoxylan	5.80 \pm 0,20	3.30 \pm 0,20	2.50 \pm 0,40 _a
<i>B. Longum</i>	Kontrol	6.03 \pm 0,06	3.73 \pm 0,06	2.30 \pm 0,00 _a
	FOS	6.16 \pm 0,32	2.22 \pm 0,06	3.83 \pm 0,29 _c
	Glukan	6.10 \pm 0,44	2.53 \pm 0,15	3.56 \pm 0,59 _{bc}
	Arabinoxylan	6.03 \pm 0,55	2.50 \pm 0,17	3.53 \pm 0,72 _{bc}

Keterangan : Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama, berbeda nyata pada uji BNT dengan α 1%

Pada Tabel 5.7 menunjukkan rerata nilai pH *B. longum* dan *L. casei* dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan pada masa inkubasi jam ke-0 sampai jam ke-18. Perubahan nilai pH dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan dari jam ke 0 yaitu sebesar 5,70 \pm 0,10 - 6,0 \pm 0,55 sedangkan jam ke 18 menurun hingga mencapai 3,7 \pm 0,06 - 2,2 \pm 0,06. Hasil penurunan pH menunjukkan bahwa kedua bakteri menggunakan sumber karbon yang terdapat di dalam media dengan penambahan ekstrak ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukukan dan arabinoxylan untuk dikonversi menjadi asam-asam organik, hal ini disebabkan karena penurunan pH merupakan salah satu akibat dari proses fermentasi bakteri dalam memanfaatkan substrat.

Selisih penurunan pH tertinggi adalah dengan penambahan jenis ekstrak kasar fruktooligosakarida pada bakteri *B. longum* sebesar 3,83 \pm 0,29, sedangkan untuk *L. casei* dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) penurunannya hanya sampai 3,10 \pm 0,10. Penurunan nilai pH tersebut menunjukkan bahwa toleransi *B. longum* terhadap pH lebih tinggi dibandingkan dengan *L. casei*. Hal ini sesuai dengan analisa jumlah bakteri yang menunjukkan bahwa *B. longum* dengan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) lebih tinggi daripada *L. casei* dengan jenis ekstrak kasar yang sama. Bakteri *B. longum* menghasilkan energi yang lebih tinggi melalui siklus *bifidum* dengan menghasilkan 2,5 ATP dibanding *L. casei* sebesar 2 ATP. ATP (*Adenosina triposfat*) yang dihasilkan berfungsi untuk membangun materi sel dari nutrisi dilingkungannya sehingga *B. longum* lebih cepat dalam reaksi menghidrolisis substrat untuk menghasilkan asam dengan meningkatnya ion H⁺ terdisosiasi yang berpengaruh dalam penurunan pH (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Umumnya secara keseluruhan setiap perlakuan menghasilkan penurunan nilai pH yang tidak berbeda signifikan dengan menghasilkan notasi yang sama pada setiap hasil perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa kedua bakteri dengan penambahan jenis ekstrak maupun kontrol mampu bertahan pada kondisi pH yang rendah karena golongan *L. casei* dan *B. longum* termasuk bakteri probiotik yang keberadaannya optimal di dalam saluran pencernaan (Hardiningsih dkk, 2006; Fric, 2007). Pada proses fermentasi kondisi pH mempengaruhi aktifitas enzim dalam mengikat substrat karena dipengaruhi oleh konsentrasi ion H^+ yang disebabkan oleh tingginya nilai total asam organik seperti asam asetat, propionat dan butirrat sehingga nilai pH yang terukur cenderung rendah (Goronov *et al.*, 2013). Peningkatan aktifitas enzim terjadi pada kondisi pH optimum, dimana pH media sesuai dengan pertumbuhan bakteri. Kondisi pH optimum mempengaruhi sistem kerja bakteri dalam mengikat substrat dan memanfaatkannya, tetapi bila pH media tidak sesuai maka mikroba tidak akan melakukan proses metabolisme dengan baik, hal ini dapat menyebabkan nutrisi dan transfer elektron yang masuk kedalam sel akan terhambat sehingga sistem kerja enzim menjadi tidak fungsional (Panesar *et al.*, 2010)

Bakteri *B. longum* dan *L. casei* pada media kontrol menunjukkan kondisi pH dengan penurunan yang rendah, hal ini disebabkan karena kurangnya aktifitas enzim pada kedua bakteri untuk mengikat sumber karbon yang terbatas pada media kontrol. Sesuai dalam penelitian Salminen *et al.* (2004) dimana bakteri membutuhkan sumber karbon untuk pertumbuhannya, namun pada media MRSB hanya terdiri dari mineral, vitamin dan protein tanpa sumber karbon. Bakteri hanya memanfaatkan yeast ekstrak dan pepton yang dapat dijadikan sumber karbon untuk pertumbuhannya sehingga mempengaruhi bakteri dalam memproduksi asam.

Hubungan antara penurunan pH erat kaitannya dengan jumlah bakteri yang terdapat di dalam medium. Besarnya jumlah bakteri akan menghasilkan metabolit utama berupa asam organik seperti asam asetat yang dapat mempengaruhi dalam penurunan pH. Hubungan tersebut dapat diketahui berdasarkan nilai absorbansi (OD) bakteri *B. longum* dan *L. casei* dengan penurunan pH. Hubungan antara nilai absorbansi (OD) dengan penurunan pH dapat dilihat pada Gambar 5.4

Gambar 5.4 Hubungan antara nilai OD dan pH pada Bakteri *B. longum* dan *L. casei* dengan Berbagai Perlakuan Penambahan Jenis Ekstrak kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan

Pada Gambar 5.4 menunjukkan hubungan regresi linier antara penurunan derajat keasaman (pH) dengan peningkatan nilai absorbansi (OD) *B. longum* dan *L. casei*, dimana nilai pH berbanding terbalik dengan nilai absorbansi (OD), dengan mengikuti persamaan $y = -4,404x + 6,071$ dan determinasi 0,878. Dari determinasi tersebut diketahui bahwa 87,8% derajat keasaman (pH) dipengaruhi oleh nilai absorbansi atau *optical density* (OD) bakteri *B. longum* dan *L. casei*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena analisa pH bergantung pada jumlah ion H^+ yang terdisosiasi dari total asam organik seperti asam asetat, sehingga antara pH dan nilai OD tingkat korelasinya besar. Semakin tinggi jumlah bakteri *B. longum* dan *L. casei* maka semakin tinggi dalam menurunkan derajat keasaman medium fermentas

4.5 Pengaruh Penambahan Ekstrak Kasar Fruktooligosakarida (FOS), Glukan dan Arabinoxylan Terhadap Short Chain Fatty acid (SCFA) Bakteri *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus casei*

Short Chain fatty acid (SCFA) adalah senyawa metabolit utama yang dihasilkan selama proses fermentasi oleh bakteri di dalam usus besar manusia (Kingwatee *et al.*, 2014). SCFA terdiri atas asam asetat, propionat dan butirrat yang dihasilkan dari hidrolisis golongan prebiotik yang tahan terhadap asam atau enzim pencernaan manusia. Menurut Roberfroid (2007) prebiotik yang resisten terhadap asam atau enzim bukan berarti sama sekali tidak dapat dicerna, melainkan dapat sampai kedalam usus besar dengan jumlah yang cukup untuk kebutuhan mikroorganisme usus sehingga dapat dihidrolisis untuk menghasilkan metabolit SCFA. Rerata kadar SCFA selama fermentasi akibat pengaruh penambahan berbagai ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS), glukan dan arabinoxylan terhadap jenis bakteri *B. longum* dan *L. casei* jam ke 18 dapat dilihat pada Gambar 5.8

Tabel 5.8 Rerata Kadar SCFA *B. longum* dan *L. casei* Jam ke 18

Jenis Bakteri	Ekstrak	Asetat	Propionat	Butirat
<i>L. casei</i>	Kontrol	130,771 ± 13,46 _{bcd}	4,536 ± 6,42 _a	1,919 ± 1,67 _a
	FOS	140,942 ± 48,86 _{bcd}	0,000 ± 0,0 _a	8,991 ± 12,72 _a

	Glukan	166,241 \pm 19,75 _d	0,000 \pm 0,0 _a	0,276 \pm 0,39 _a
	Arabinoxylan	152,272 \pm 7,07 _{bcd}	0,000 \pm 0,0 _a	0,920 \pm 1,30 _a
<i>B. longum</i>	Kontrol	116,137 \pm 46,02 _b	3,383 \pm 4,78 _a	2,434 \pm 0,20 _a
	FOS	243,827 \pm 36,17 _e	0,000 \pm 0,0 _a	0,417 \pm 0,59 _a
	Glukan	158,825 \pm 15,02 _{cd}	0,000 \pm 0,0 _a	0,256 \pm 0,36 _a
	Arabinoxylan	142,980 \pm 18,98 _{bcd}	0,000 \pm 0,0 _a	1,760 \pm 2,49 _a

Pada Tabel 5.8 menunjukkan bahwa produksi asam propionat dan asam butirat menghasilkan notasi yang sama yaitu tidak adanya perbedaan yang nyata, kecuali perlakuan terhadap produksi asam asetat. Penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) pada bakteri *B. longum* menghasilkan nilai tertinggi dengan nilai asam asetat mencapai 243,827 \pm 36,17 mmol/l lebih besar dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan karena *B. longum* merupakan bakteri penghasil asam asetat yang lebih tinggi dibanding asam organik lainnya, dimana secara umum *B. longum* selama fermentasi menghasilkan 3 asam asetat dan 2 asam laktat (Umam dkk. 2012).

Ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) dimetabolisme oleh *B. longum* melalui jalur *bifidum* atau fruktosa-6—fosfat. Ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) melalui sistem transport *bifidum* akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa dengan memecah ikatan glikosidik β (1 \rightarrow 2) atau β (1 \rightarrow 6) oleh enzim β -fruktofuranosidase menjadi asam asetat dengan jumlah yang lebih tinggi dibanding asam propionat maupun butirat (Pokusaeva *et al.*, 2011). Keberadaan ekstrak kasar fruktooligosakarida (FOS) sebagai sumber karbon mampu meningkatkan pertumbuhan *B. longum* untuk menghasilkan metabolit utama berupa asam asetat di dalam saluran pencernaan, sehingga meningkatnya *barrier* atau pertahanan jaringan epitel usus dari bakteri patogen.

Nilai asam asetat menghasilkan nilai tertinggi pada masing-masing perlakuan dibandingkan asam propionat dan asam butirat. Hal ini disebabkan karena mekanisme perubahan substrat menjadi asam asetat melalui jalur metabolisme lebih singkat dibandingkan dengan asam propionat dan asam butirat (Velazquez *et al.*, 2000). Asam asetat dihasilkan dari pemecahan karbohidrat menjadi glukosa kemudian diubah menjadi piruvat, dari piruvat pembentukan asam asetat dapat dilakukan dengan dua cara yaitu langsung

diubah menjadi asam asetat atau melalui perubahan senyawa antara asetil CoA kemudian langsung menjadi asam asetat (Nurcholis dan Zubaidah, 2011).

Asam lainnya yang terdapat dalam SCFA yaitu asam propionat, dimana asam ini merupakan hasil pemecahan senyawa prebiotik yang dimetabolisme dalam hati. Asam ini mampu menurunkan kolesterol darah dan mencegah pembentukan kolesterol dalam hati. Asam propionat hampir secara keseluruhan tidak terdeteksi pada semua perlakuan kecuali pada kontrol baik itu pada bakteri *L. casei* maupun *B. longum* masing-masing $4,536 \pm 6,42$ dan $3,583 \pm 4,78$ mmol/l. Sesuai dengan penelitian Stewart *et al.* (2008) dimana kontrol memberikan nilai propionat yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan ekstrak, hal ini dapat disebabkan karena bakteri lebih mudah mendegradasi substrat yang lebih sederhana dibandingkan penambahan ekstrak kasar fruktooligosakarida, glukosa dan arabinoksilan, selain itu selama fermentasi konsentrasi propionat semakin menurun walaupun secara umum harusnya terjadi peningkatan dengan semakin tingginya waktu fermentasi namun hal itu dapat diakibatkan karena bakteri lebih tinggi dalam memproduksi asetat dan butirat.

Asam butirat paling tinggi dihasilkan oleh perlakuan *L. casei* pada media fruktooligosakarida (FOS) yaitu $8,991 \pm 12,72$ mmol/l. Hal ini dapat disebabkan karena substrat fruktooligosakarida (FOS) dapat meningkatkan efek *butirogenik* dari *L. casei*. Hal ini sesuai dengan penelitian Pan *et al.* (2009) bahwa penambahan substrat fruktooligosakarida (FOS) dapat meningkatkan produksi *short chain fatty acid* (SCFA) khususnya asam butirat karena digunakan sebagai sumber energi untuk kolonisasi golongan bakteri *Lactobacillus*. Bakteri *L. casei* merupakan bakteri heterofermentatif fakultatif yang menghasilkan asam asetat dan laktat serta sebagian kecil karbondioksida. Produksi asam butirat yang tinggi dapat disebabkan karena adanya perubahan dari asam asetat dan asam laktat untuk menghasilkan asam butirat melalui jalur butiril CoA atau asetil CoA transferase (Morrison *et al.*, 2006). Asam butirat dimetabolisme dalam sel epitel usus dan berfungsi dalam re-generasi sel, menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan menghambat proliferasi sel kanker pada usus (Velazquez *et al.*, 2000).